

財団法人 日中医学協会

2012 年度共同研究等助成金報告書—調査・共同研究—

2013 年 3 月 13 日

財団法人 日中医学協会 御中

貴財団より助成金を受領して行った調査・共同研究について報告いたします。

添付資料：研究報告書

受給者氏名：西岡 安彦
所属機関名：徳島大学大学院
所属部署名：呼吸器・膠原病内科学
所在地：徳島市蔵本町 3-18-15
電 話：088-633-7127



職名：教授

内線：

1. 助成金額： 800,000 円

2. 研究テーマ

Focal adhesion kinase 阻害薬を用いた肺線維症に対する分子標的治療の開発

3. 研究組織：

日本側研究者氏名：西岡 安彦

職名：教授

所属機関名：徳島大学大学院

部署名：呼吸器・膠原病内科学

中国側研究者氏名：文 富強

職名：教授・主任

所属機関名：四川大学附属華西病院

部署名：呼吸器内科

4. 当該研究における発表論文等

2013 年 6 月 22 日第 12 回肺サーファクタント研究会で発表予定

Focal adhesion kinase阻害薬を用いた肺線維症に対する分子標的治療の開発

研究者氏名	教授 西岡 安彦
日本所属機関	徳島大学大学院
中国研究者氏名	教授・主任 文 富強
中国所属機関	四川大学附属華西病院

要 旨：

Focal adhesion kinase (FAK)は、インテグリンを介した細胞運動能や遊走能に関与する125kDaのチロシンキナーゼである。フィブロネクチンなどの細胞外基質からのシグナルを伝達するとともに、増殖因子レセプターからのシグナル伝達に関与する。マウス線維化肺においてFAK Y397がリン酸化されていることが確認されており、FAKリン酸化阻害は抗線維化効果を期待できる可能性がある。そこで我々はマウスブレオマイシン (bleomycin: BLM) 肺線維症モデルを用いてFAKチロシンリン酸化阻害薬TAE226の抗線維化効果を検討した。TAE226はヒトおよびマウス肺線維芽細胞のFAK Y397のリン酸化を抑制した。さらにTAE226は、肺線維芽細胞の増殖を用量依存性に阻害し、transforming growth factor (TGF)- β によって増強されるコラーゲン産生と α -smooth muscle actin (SMA)発現を抑制した。*In vivo*実験の結果から、TAE226投与はマウスBLM肺線維症モデルにおける肺の線維化とコラーゲン産生を抑制した。Ki-67染色による検討結果から、TAE226処理は線維化肺において増殖している肺線維芽細胞の数を減少させることが明らかとなった。以上からFAKを標的としたアプローチは抗線維化療法として有効である可能性が示唆された。

Key Words：肺線維症、FAK、線維芽細胞、ブレオマイシン、チロシンリン酸化

緒 言：

Focal adhesion kinase (FAK)は、インテグリンを介した細胞運動能や遊走能に関与する125kDaのチロシンキナーゼである^{1,2)}。フィブロネクチンなどの細胞外基質からのシグナルを伝達するとともに、増殖因子レセプターからのシグナル伝達にも関与する³⁾。がん細胞の遊走、浸潤、増殖に深く関与していることが報告されており、FAKを標的とした低分子阻害薬の開発が試みられている。既に動物モデルを用いた検討から、神経膠芽腫や卵巣がんに対するFAK阻害薬の抗腫瘍効果が報告されている^{4,5)}。一方、マウス線維化肺においてFAK Y397がリン酸化されていることが確認されており⁶⁾、またtransforming growth factor (TGF)- β による線維芽細胞の筋線維芽細胞への分化にFAKが介在しているとする報告がある⁷⁾。また、我々はCCN(CYR61、CTGF、NOV)ファミリーであるCCN6がインテグリンを介してFAK Y397をリン酸化することを報告している⁸⁾。以上から、FAKを介するシグナルが肺線維症において重要な役割を果たしている可能性があり、FAKリン酸化阻害は抗線維化効果を期待できる可能性がある。

対象と方法：

FAK阻害による抗線維化効果を検討するため、本研究においてはFAK阻害薬であるTAE226(ノバルティス社より供与)を使用した。C57BL/6マウス肺より作成した線維芽細胞株及びヒト肺線維芽細胞(MRC-5)を使用し、3H-TdR取り込み試験にて増殖反応を検討した。肺線維芽細胞の筋線維芽細胞への分化に及ぼす効果の検討は、TGF- β にて誘導される α -smooth muscle actin (SMA)発現をWestern blottingで評価することで行った。また、肺線維芽細胞のcollagen I産生に及ぼす効果を同様にWestern Blotにて検討した。また、C57BL/6マウスのブレオマイシン(BLM)肺線維症モデルを用いてTAE226の抗線維化効果の検討を

開始した。day1 に BLM(125mg/kg)を充填したポンプを C57BL/6 マウスの皮下に留置し、1 週間で持続皮下投与することで肺線維症モデルを作成した。day15~day28 に TAE226(30 mg/kg)を連日経口投与し、day29 に sacrifice したマウス右肺のヘマトキシリン・エオジン染色標本を用いて肺線維化スコア (Ashcroft Score) で検討した。また左肺は、Sircol collagen キットを用いてコラーゲン含量を定量した。さらに、Ki-67 に対する免疫染色を行いマウス線維化肺組織の中での増殖細胞をカウントした。

結果:

- 1) TAE226の肺線維芽細胞に対するFAK Tyr397のリン酸化抑制効果

C57BL/6マウス肺線維芽細胞に対するTAE226のFAK Y397リン酸化抑制効果を検討した(図1)。その結果、TAE226は、5 μ M以上の濃度でFAK Y397のリン酸化を抑制した。

- 2) TAE226の肺線維芽細胞に対する増殖抑制効果

C57BL/6マウス肺線維芽細胞およびMRC5細胞をPDGF(10 ng/ml)刺激下に培養し、TAE226の増殖能に及ぼす影響を検討した。その結果、TAE226は、C57BL/6マウス肺線維芽細胞に対しては3 μ M以上の濃度で、MRC5に対しては0.1 μ M以上の濃度で細胞増殖を抑制した。

- 3) TAE226の肺線維芽細胞の筋線維芽細胞への分化および細胞外マトリックス産生に及ぼす効果

MRC5細胞をTGF- β (5ng/ml)存在下で培養し、TGF- β によって促進された α -SMAのおよびコラーゲン I 発現に対してTAE226が与える影響を検討した。TAE226はTGF- β 刺激により促進された α -SMAおよびコラーゲン I の発現を濃度依存的に抑制した(図3)。

- 4) BLM肺線維症モデルにおけるTAE226の肺線維症抑制効果
- BLM投与開始後、28日目の肺組織におけるAshcroft scoreの検討から、TAE226 30mg/kg/日の投与により、BLMにより惹起された肺線維化が有意に抑制されていることが組織学的に確認された(図4)。また、上記の肺組織をKi67染色にて評価した結果、BLM単独群と比較してTAE226投与群では特に肺間質に存在するKi67陽性細胞数が有意に減少しており、TAE226はin vivoにおいても肺線維芽細胞の増殖を抑制していることが確認された。

考察:

今回の検討からFAK阻害剤は肺線維芽細胞の増殖を抑制すること、さらには線維芽細胞から筋線維芽細胞への分化を抑

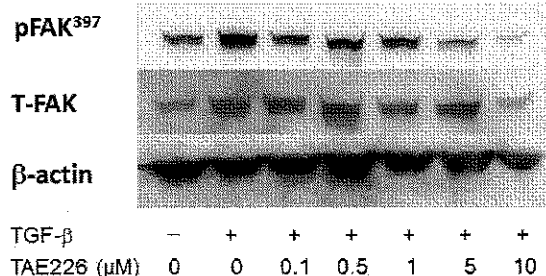


図1 TAE226の肺線維芽細胞に対するFAK Tyr397のリン酸化抑制効果

C57BL/6マウス肺線維芽細胞をTGF- β (10 ng/ml)および種々の濃度のTAE226存在下に24時間培養し、lysateを作成した。7.5%SDS-PAGE後に、抗FAKおよび抗リン酸化FAK(Y397)抗体を用いてWestern blottingで検討した。

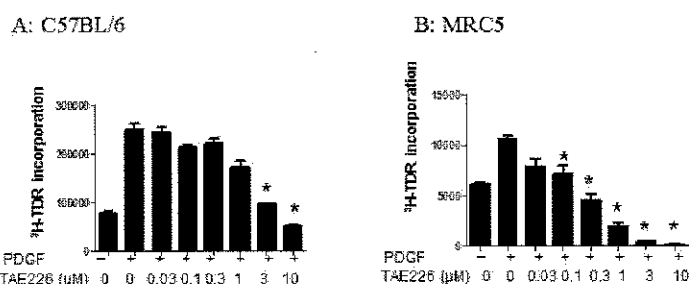


図2 TAE226の肺線維芽細胞に対する増殖抑制効果

C57BL/6マウス肺線維芽細胞(A)およびMRC5細胞(B)を、PDGF(10 ng/ml)存在下に54時間培養した。同時に種々の濃度のTAE226を添加した。その後1 μ Ciの³H-TdRを添加し、18時間培養後に測定し増殖能を算出した。*P<0.05

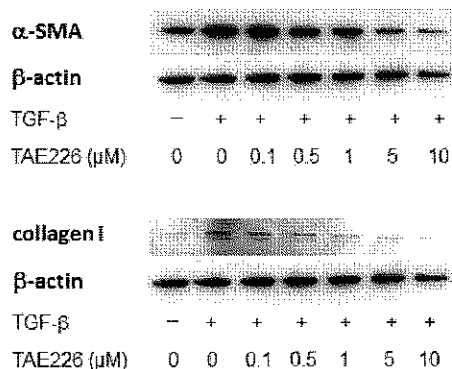


図3 TAE226の肺線維芽細胞の筋線維芽細胞への分化および細胞外マトリックス産生に及ぼす効果

MRC5細胞を、TGF- β (10 ng/ml)および種々の濃度のTAE226存在下に24時間培養し、lysateを作成した。7.5%SDS-PAGE後に、 α -SMAおよびコラーゲンIに対する抗体を用いてWestern blottingで検討した。

制することにより肺線維症に対する抑制効果を発揮することが確認された。BLM肺線維症モデルでは、FAK阻害剤は後半の2週間のみ投与されていることから、BLMで誘導される早期の炎症を抑制することによる抗線維化効果ではなく、恐らく直接肺線維芽細胞に作用することによって発揮された抗線維化効果であると思われる。現在FAK阻害剤は、がん分子標的治療薬として開発が進められているが、肺線維芽細胞増殖抑制作用、筋線維芽細胞への分化抑制作用、コラーゲン産生抑制作用を併せ持つことから、抗線維化薬としての応用も期待される。一方、TAE226については、IGF-1レセプターやインスリンレセプターに対する阻害作用があり、血糖値に影響を及ぼすことが報告されている。現在、さらにFAK特異的な阻害薬が開発されつつあり、今後このような第2世代のFAK阻害薬の抗線維薬としての可能性を検討することが重要と思われる。

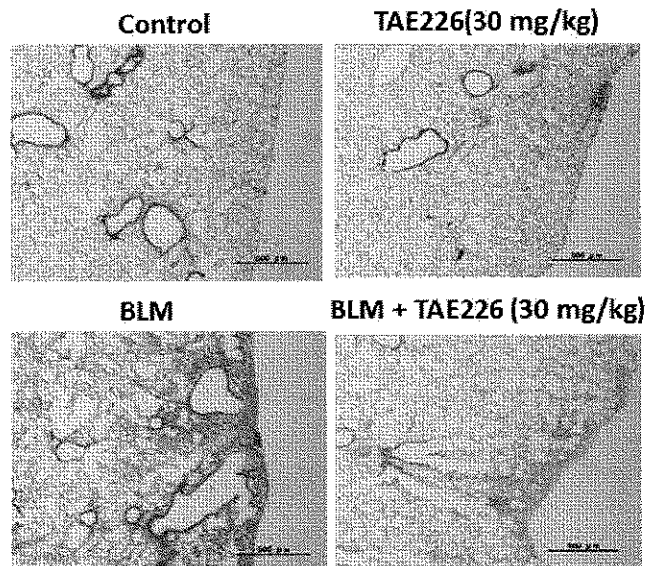


図4 BLM肺線維症モデルにおけるTAE226の肺線維化抑制効果

C57BL/6マウスにBLM(125mg/kg)を投与し、肺線維症モデルを作製した。TAE226(30 mg/kg/day)は、day14よりday28まで連日経口投与し、day 28にH&E染色で肺線維化を検討した。

参考文献：

1. Schaller MD, et al., pp125FAK, a structurally distinctive protein-tyrosine kinase associated with focal adhesions. Proc Natl Acad Sci USA 89: 5192-5196, 1992.
2. Hanks SK, et al., Focal adhesion protein-tyrosine kinase phosphorylation in response to cell attachment to fibronectin. Proc Natl Acad Sci USA 89: 8487-8491, 1992.
3. Sieg DJ, et al., FAK integrates growth-factor and integrin signals to promote cell migration. Nat Cell Biol 2: 249-257, 2000.
4. Liu T-J, et al., Inhibition of both focal adhesion kinase and insulin-like growth factor-I receptor kinase suppresses glioma proliferation in vitro and in vivo. Mol Cancer Ther 6: 1357-1367, 2007.
5. Halder J, et al., Therapeutic efficacy of a novel focal adhesion kinase inhibitor TAE226 in ovarian carcinoma. Cancer Res 67:10976-10983, 2007.
6. Vittal R et al., Modulation of prosurvival signaling in fibroblasts by a protein kinase inhibitor protects against fibrotic tissue injury. Am J Pathol 166: 367-375, 2005.
7. Thannickal VJ et al., Myofibroblast differentiation by transforming growth factor- β 1 is dependent on cell adhesion and integrin signaling via focal adhesion kinase. J Biol Chem 278: 12384-12389, 2003.
8. Batmunkh R et al., CCN6 as a profibrotic mediator that stimulates the proliferation of lung fibroblasts via the integrin β 1/focal adhesion kinase pathway. J Med Invest. 58(3-4): 188-96, 2011.

注：本研究は、2013年6月22日第12回肺サーファクタント研究会で発表予定

作成日：2013年 3月 12日